



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 48/00, 38/17, C12N 15/12</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/03506</p> <p>(43) 国際公開日 1999年1月28日(28.01.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03198</p> <p>(22) 国際出願日 1998年7月16日(16.07.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/191635 1997年7月16日(16.07.97)</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 杉山治夫(SUGIYAMA, Haruo)[JP/JP] 〒562-0036 大阪府箕面市船場西2-19-30 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: REMEDIES FOR SOLID TUMOR CONTAINING WILMS' TUMOR GENE (WT1) EXPRESSION INHIBITORS</p> <p>(54)発明の名称 ウイルムス腫瘍遺伝子(WT1)に対する発現阻害物質を含んで成る固形腫瘍治療剤</p> <p>(57) Abstract Remedies for solid tumor which contain Wilms' tumor gene (WT1) expression inhibitors (antisense oligonucleotide derivatives, WT1 mutation genes, WT1 mutation proteins, lower-molecular-weight substances, etc.).</p>		

(57)要約

本願発明は、ウィルムス腫瘍遺伝子（W T 1）に対する発現阻害物質（アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体、W T 1 変異遺伝子、W T 1 変異タンパク質、低分子物質等）を含んで成る固形腫瘍治療剤に係るものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	JP	日本	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KR	韓国	SD	スーダン		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン				

明 細 書

ウィルムス腫瘍遺伝子（W T 1）に対する発現阻害物質を含んで成る固形腫瘍治療剤

発明の分野

本発明はウィルムス腫瘍遺伝子（W T 1）に対する発現阻害物質を含んで成る、固形腫瘍治療剤に関する。

背景技術

ウィルムス(Wilms) 腫瘍は、染色体 1 1 p 1 3 に位置するウィルムス腫瘍遺伝子（W T 1）の両対立遺伝子の不活性化により生ずる小児腎腫瘍である(Call KM et al., Cell 60: 509, 1990)。W T 1 の非コード上流配列 (C. E. Campbellら、Oncogene 9: 583-595, 1994)及びイントロンを含むコード領域(D. A. Haberら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9618-9622, (1991))はすでに報告されており、腫瘍等の増殖及び分化に関与することが予想される(D. A. Haberら、前掲)。

また、本発明者らは、W T 1 が白血病細胞の増殖に関与している (K. Inoue, et al., Blood, 84 (9) 3071-3079 (1994)) ことから、W T 1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が白血病細胞の増殖を抑制・阻害することを見い出した (P C T特許公開W O 9 6 / 3 8 1 7 6、及びT. Yamagami, et al., Blood, 87 (7) 2878-2884 (1996))。しかしながら、W T 1 の発現阻害物質が固形腫瘍の増殖を抑制・阻害することは知られていない。

発明の開示

従って本発明は、ウイルムス(Wilms) 腫瘍遺伝子(WT1) に対する発現阻害物質を含んで成る固形腫瘍の治療剤を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、胃癌AZ521株の細胞の増殖に対する100 μ g/mlのオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

図2は、胃癌AZ521株の細胞の増殖に対する200 μ g/mlのオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

図3は、胃癌AZ521株の細胞の増殖に対する400 μ g/mlのオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

図4は、肺癌OS3株の細胞の増殖に対する200 μ g/mlのオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

図5は、肺癌OS3株の細胞の増殖に対する400 μ g/mlのオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

図6は、卵巣癌TYKn株の細胞の増殖に対する400 μ g/mlのオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

図7は、WT1発現陰性の肺アデノカルシノーマ細胞系、WTASSPC14の細胞の増殖に対する400 μ g/mlのオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

発明の実施の態様

本発明は、WT1に対する発現阻害物質を含んで成る固形腫瘍治療剤を提供する。ここで、固形腫瘍とは、例えば胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等である。本発明で使用するWT1に対する発現阻害物質は、WT1の発現を阻害するものであれば何でもよく、た

例えば、WT 1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体、WT 1 に対して dominant negative に働く WT 1 変異遺伝子および変異タンパク質、デコイ DNA などの低分子阻害物質または WT 1 に特異的に結合し転写活性を阻害するペプチドなどの低分子阻害物質など挙げられる。本発明で使用するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、例えば、WT 1 の転写キャッピング部位に対するもの、翻訳開始領域に対するもの、エクソンに対するものまたはイントロンに対するものなどの WT 1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体である。

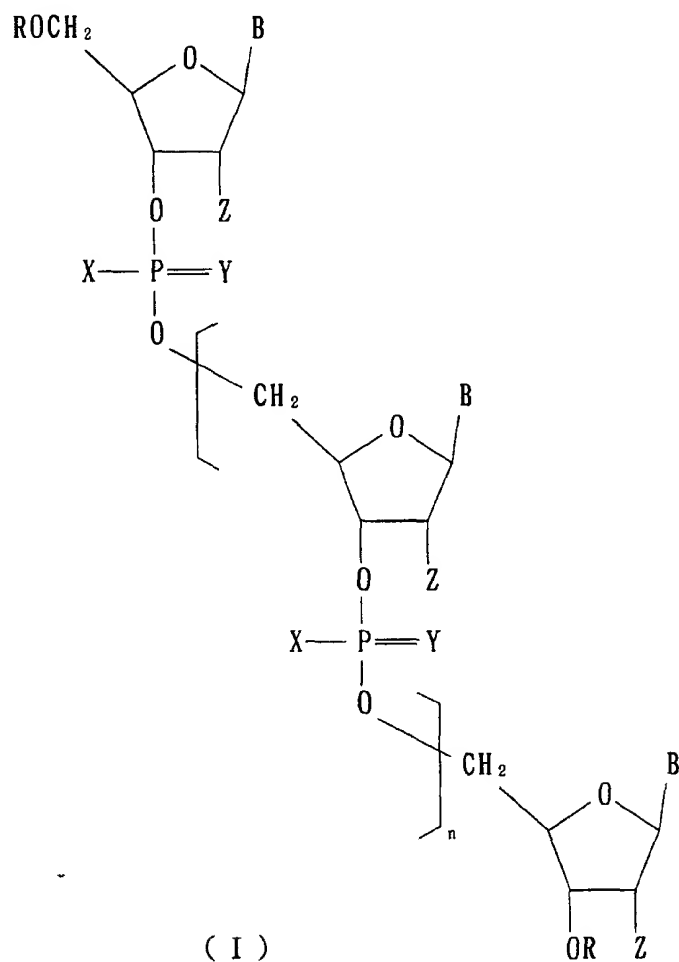
例えば WT 1 の転写キャッピング部位を含む領域のセンス DNA 鎖の塩基配列は配列番号：9 で表わされ、また WT 1 のコード領域のエクソン 1 ～ 10 のセンス DNA 鎖の塩基配列は配列番号：10 ～ 19 で表わされるが、本発明はこのような WT 1 のセンス DNA 鎖の塩基配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を用いる。このアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、通常 WT 1 のアンチセンス DNA 鎖または RNA 鎖の連続した 5 ～ 50 個、好ましくは、9 ～ 30 個の塩基または WT 1 の DNA 鎖または RNA 鎖に結合することができるものであれば、断続的または部分的に相補的な 5 ～ 70 個、好ましくは、9 ～ 50 個の塩基から成るアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体である。

転写キャッピング部位に対するものとしては、例えば次の塩基配列：5' -AGGGTCGAATGCGGTGGG -3' (配列番号：2) 及び 5' -TCAATAAGAGGGGCCGG -3' (配列番号：4) などのものが挙げられる。また、翻訳開始領域に対するものとしては、翻訳開始コドン ATG 並びにその上流及び／又は下流を含む領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が挙げられ、例えば次の塩基配列：5' -GTCGGAGCCCATTTGCTG -3' (配列番号：6) などが挙げられる。

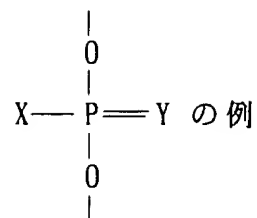
また、WT1のコード領域には10個のエクソンが含まれており、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、これらのエクソンのいずれかに含まれる配列に対するもの、又はスプライシング後に連続するいずれか2個のエクソンにわたる配列に対するものあるいは、連続するイントロンとエクソンにわたる配列に対するもの、全てのイントロン及び3', 5'側非コード領域の配列に対するものである。1例として、第6エクソンに対するものであり、次の塩基配列：5'-CGTTGTGTGGTTATCGCT-3'（配列番号：8）に対するものが挙げられる。

さらに、WT1のDNA鎖またはRNA鎖と断続的または部分的に相補的な塩基配列を有する本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は対応する領域については特に問わないが、これらの中には、WT1のDNA鎖またはRNA鎖を切断する機能を有するリボザイムのようなものも含まれる。

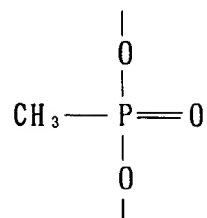
本発明において使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の構造は、化1に示したとおりであるが、Xは独立して酸素(O)、イオウ(S)、低級アルキル基あるいは一級アミンまたは二級アミンのいずれでもよい。Yは独立して酸素(O)あるいはイオウ(S)のいずれでもよい。Zは水素または水酸基である。BはZが水素のときアデニン、グアニン、チミン、あるいはシトシンのいずれかから選ばれ、Zが水酸基のときアデニン、グアニン、ウラシルあるいはシトシンのいずれかから選ばれ、主としてWT1をコードするDNA又はmRNAの相補的オリゴヌクレオチドである。Rは独立して水素またはジメトキシトリチル基あるいは低級アルキル基である。nは7-28である。



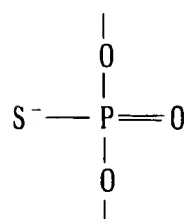
好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体としては修飾されていないアンチセンスオリゴヌクレオチドだけでなく、修飾されたアンチセンスオリゴヌクレオチドでもよい。この様な修飾体として、例えば前述のメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、その他ホスホロチオエート修飾体あるいはホスホロアミデート修飾体等が挙げられる（化2参照）。



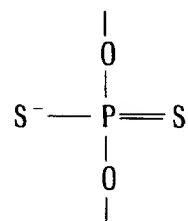
メチルホスホネート



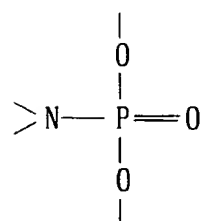
ホスホロチオエート



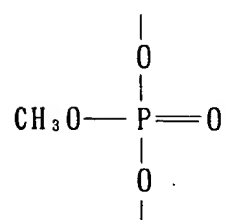
ホスホロジチオエート



ホスホロアミデート



リン酸トリエステル



これらのアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は次のとおり常法によって得ることができる。

式 (I) の X 及び Y が O、Z が水素又は水酸基であるアンチセンスオリゴヌクレオチドは市販の DNA 合成装置 (例えば Applied Biosystems 社製など) によって容易に合成される。

Z が水素であるアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成法はホスホロアミダイトを用いた固相合成法、ハイドロジェンホスホネートを用いた固相合成法などで得ることができる。

例えば、T. Atkinson, M. Smith, in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, ed. M. J. Gait, IRL Press, 35-81 (1984); M. H. Caruthers, *Science*, 230, 281 (1985); A. Kume, M. Fujii, M. Sekine, M. Hata, *J. Org. Chem.*, 49, 2139 (1984); B. C. Froehler, M. Matteucci, *Tetrahedron Lett.*, 27, 469 (1986); P. J. Gar egg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Stromberg, C. Henrichson, *ibid.*, 27, 4051 (1986);

B. S. Sproat, M. J. Gait, in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, ed. M. J. Gait, IRL Press, 83-115 (1984); S. L. Beaucage and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 22, 1859-1862 (1981); M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 21, 719-722 (1980); M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3185-3191 (1981)を参照のこと。

X が低級アルコキシ基であるリン酸トリエステル修飾体は、常法、例えば化学合成で得られたオリゴヌクレオチドをトシルクロリドの DMF / メタノール / 2, 6 - ールチジン溶液で処理することにより得ることができる (Moody H. M., et al., *Nucleic Acids Res.*, 17, 4769-4782 (1989))。

X がアルキル基であるアルキルホスホネート修飾体は、常法、例えばホスホアミダイトを用いて得ることができる (M. A. Dorman, et al., *Tetrahedron*, 40, 95-102 (1984); K. L. Agarwal and F. Rift

ina, Nucleic Acids Res., 6, 3009-3024 (1979))。

XがSであるホスホロチオエート修飾体は、常法、例えばイオウを用いた固相合成法(C.A.Stein, et.al., Nucleic Acids Res., 16, 3209-3221 (1988))あるいはテトラエチルチウラム ジスルフィドを用いて、固相合成法により得ることができる(H.Vu and B.L.Hirschbein, Tetrahedron Letters, 32, 3005-3008 (1991))。

X, YがともにSであるホスホロジチオエート修飾体は、例えばビスアミダイトをチオアミダイトに変換しイオウを作用させることにより固相合成法により得ることができる(W.K.-D.Brill, et.al., J. Am. Chem. Soc., 111, 2321-2322 (1989))。

Xが一級アミンあるいは二級アミンであるホスホロアミデート修飾体は、例えばハイドロジェンホスホネートを一級あるいは二級アミンで処理することにより固相合成法で得ることができる(B.Froehner, et.al. Nucleic Acids Res., 16, 4831-4839 (1988))。あるいは、アミダイトをtert-ブチルヒドロパーオキシドで酸化しても得ることができる(H.Ozaki, et.al., Tetrahedron Lett., 30, 5899-5902 (1989))。

Zが水酸基であるアンチセンスオリゴリボヌクレオチドの合成法は、アンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドに比べて、リボース(糖)に2'-水酸基があるためその保護を行わなければならない点できわめて複雑ではあるが、保護基およびリン酸化方法を適宜選択することによって合成することができる(微生物学基礎講座

8巻、遺伝子工学、大塚栄子、三浦一伸共著、安藤忠彦、坂口健二編、1987年10月10日、共立出版株式会社発行参照)。

精製および純度確認は、高速液体クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行うことができる。分子量の確認は、Electrospray Ionization Mass Spectrometry又はFast Atom Bombardment Mass Spectrometryで行うことができる。

rdment-Mass Spectrometryで行うことができる。

本発明のWT1に対する発現阻害物質は、genomic DNA から matureなmRNAに至るいかなる段階においても作用し、その発現を抑制することによって固形腫瘍細胞の増殖を阻害すると考えられる。従って、本願発明の発現阻害物質は固形腫瘍の治療のために有効であると期待される。

本発明の発現阻害物質は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤などの外用剤とすることができる。

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法に従って調製することができる。

本発明の発現阻害物質は患者の患部に直接適用するか、または血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適応させる。さらに持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リポゾーム、ポリ-L-リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

本発明の発現阻害物質の投与量は、患者の状態、年齢、性別、体重などに応じて適宜調整し好ましい量を用いることができる。また、その投与方法は、患者の状態、薬剤形態などに応じ、経口投与、筋肉内投与、腹腔内投与、胸腔内投与、髄腔内投与、腫瘍内投与、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、動脈内投与、直腸投与などの種々の投与方法から適宜好ましい方法を用いることができる。

以下本発明を実施例において詳しく説明する。

実施例

合成例 1.

以下に使用するオリゴデオキシリボヌクレオチド（配列番号：1～8）およびランダム配列（R a n d）を、自動合成装置（Applied Biosystems）を用いて合成し、高速液体クロマトグラフィーにより精製し、エタノール沈澱を3回行い、そしてリン酸緩衝液に懸濁した。

合成したオリゴヌクレオチドは次の通りである。なお、ランダム配列（R a n d）は、塩基18個の配列で理論上4の18乗種類の配列の混合物となっている。

配列番号：1 転写キャッピング部位のセンス配列（S E 1）

配列番号：2 転写キャッピング部位のアンチセンス配列（A S 1）

配列番号：3 転写キャッピング部位のセンス配列

配列番号：4 転写キャッピング部位のアンチセンス配列

配列番号：5 翻訳開始領域のセンス配列（S E 2）

配列番号：6 翻訳開始領域のアンチセンス配列（A S 2）

配列番号：7 エクソン6のセンス配列

配列番号：8 エクソン6のアンチセンス配列

実施例 1.

W T 1 発現陽性の胃癌 A Z 5 2 1 株の細胞を 5×10^4 個/ml、 $100 \mu\text{l}$ /ウエルの量で、平底96-ウエルプレート内の、ウシ胎児血清（F C S）を含有しない R P M I 1 6 4 0 培地に接種した。オリゴヌクレオチド A S 1 又は対照 S E 1 もしくは r a n d を、3連のウエルに、最終濃度が $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した。2時間のインキュベーションの後、各ウエルに最終濃度が10%となるように F C S を添加した。24時間毎に、前記の量の半分の

オリゴヌクレオチドを培養物に添加した。

96時間培養した後、色素排除法により生存細胞を計数した。対照培養物として、ヌクレオチドを含有しない同じ体積のPBSを添加し、そしてこの対照培養物の細胞数を100%とした。

この結果を図1に示す。この図から明らかな通り、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドAS1は、対応するセンスオリゴヌクレオチドSE1に比べて強く細胞の増殖を阻害した。

実施例 2.

実施例1と同様の実験を行ったが、オリゴヌクレオチドAS1もしくはAS2、又はrandを200 μ g/ml濃度で添加した。図2から明らかな通り、ランダム配列(rand)に比べて、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドAS1及びAS2は胃癌細胞の増殖を有意に阻害した。

実施例 3.

実施例1と同様の実験を行ったが、オリゴヌクレオチドAS1もしくはAS2、又はrandを400 μ g/mlの濃度で添加した。図3から明らかな通り、ランダム配列(rand)に比べて、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドAS1又はAS2は胃癌細胞の増殖を有意に阻害した。

なお、実施例1～3の結果から明らかなごとく本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの胃癌細胞増殖阻害効果は濃度依存的であった。

実施例 4.

実施例1と同様の実験を行ったが、固形腫瘍細胞として肺癌OS3株の細胞を用い、アンチセンスオリゴヌクレオチドAS1もしくはAS2、又は対照ランダム配列(rand)を200 μ g/mlの量で用いた。図4から明らかな通り、本発明のアンチセンスオリゴ

ヌクレオチド A S 1 及び A S 2 は対照ランダム配列 (r a n d) に比べて強い肺癌細胞増殖阻害効果を示した。

実施例 5 .

実施例 4 と同様の実験を行ったが、アンチセンスオリゴヌクレオチド A S 1 を $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は対照として S E 1 もしくは r a n d を $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ 使用した。図 5 から明らかな通り、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド A S 1 はその他の対照オリゴヌクレオチドに比べて、肺癌細胞増殖阻害効果を示した。

なお、実施例 4 及び 5 の比較から、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの肺癌細胞増殖阻害効果が濃度依存的であることが明らかである。

実施例 6 .

実施例 1 と同様の実験を行ったが、固形腫瘍細胞として、卵巣癌 T Y K n u 株の細胞を用い、アンチセンスオリゴヌクレオチド A S 1 を $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は対照オリゴヌクレオチド S E 1 もしくは r a n d を $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ 用いた。図 6 から明らかな通り、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド A S 1 は、その他の対照オリゴヌクレオチドに比べて顕著な卵巣癌細胞増殖阻害効果を示した。

参考例 1

実施例と同様の実験を行ったが、被験細胞として、W T 1 発現陰性の肺アデノカルシノーマ細胞系 W T A S P C 1 4 を用い、アンチセンスオリゴヌクレオチド A S 1 もしくは A S 2 を $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ 又は対照オリゴヌクレオチド r a n d を $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ 用いた。図 7 から明らかな通り、W T 1 発現陰性の細胞に対しては、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは有意な増殖阻害効果を示さなかった。

実施例 7 .

表 2 記載の各種の腫瘍細胞株から RNA を抽出し、下記の RT-PCR 法を用いて WT 1 mRNA の発現量を定量した。表 2 に白血病細胞株 K 5 6 2 における WT 1 の発現量を 1.0 として各種腫瘍細胞株での WT 1 の発現量を相対的に示した。

各細胞株より通常の方法〔例えば acid-guanidine-phenol-chloroform method: Anal. Biochem., 162, 156 (1987)〕に従い総 RNA を抽出し、ジエチルピロカーボネート処理水に溶解して、吸光度 260 nm にて光学的に定量化した。

1 μ g の総 RNA を含むジエチルピロカーボネート処理水 15.5 μ l を、65 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、600 U の逆転写酵素 (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: GIBCO-BRL)、500 mmol/l の各デオキシヌクレオチドトリフォスフェート (dNTP: Pharmacia)、750 ng のオリゴ dT プライマー及び 40 U の RNase 阻害剤 (Boehringer Mannheim) を含む RT 緩衝液 (50 mmol/l トリス HCl (pH 8.3); 70 mmol/l KCl; 3 mmol/l MgCl₂; 10 mmol/l ジチオスレイトール) の 14.5 μ l と混合した。

混合物を 37 $^{\circ}$ C で 90 分間インキュベートし、70 $^{\circ}$ C で 20 分間加熱後、使用時まで -20 $^{\circ}$ C にて保存した。

PCR は、DNA サーマルサイクラー (Perkin Elmer-Cetus) にて、94 $^{\circ}$ C、1 分の変性、64 $^{\circ}$ C、1 分 (β アクチン: 60 $^{\circ}$ C、1 分) のプライマーアニーリング (annealing) 及び、72 $^{\circ}$ C、2 分の鎖延長 (chain elongation) の条件で繰り返しサイクルを行ない、PCR 産物 (第 1 ラウンド PCR) を得た。

該 PCR 産物のデンストメーター単位 (後記) が 500 未満の場合には、第 1 ラウンド PCR 産物の 2.5 μ l を含む反応液にて、ネステッド内方プライマーによる第 2 ラウンド PCR を行なった。

得られた P C R 産物を、文献〔J. Immunol., 147, 4307, (1991)〕記載の方法に準じて以下の通り定量した。

即ち、20 ng の総 R N A からの P C R 産物を、0.05 μ g/ml のエチジウムブロマイドを含む 1.3% アガロースゲルに分離し、ポラロイドフィルム (Polaroid 665 film, Polaroid Corp.) にて撮影した。

ネガフィルムを、25℃、5 分間にて現像し、デンスitomーター (CS-9000 : 島津) にて検定して「デンスitomーター単位」として得た。

尚、上記において R N A 不含の場合の P C R 産物を用いた結果を陰性コントロールとした。

また、上記において使用したプライマーは表 1 に示す通りである。

表 1

第 1 ラウンド P C R プライマー	塩 基 配 列
外方センスプライマー	5' -GGCATCTGAGACCAGTGAGAA-3' (配列番号: 20)
外方アンチセンスプライマー	5' -GAGAGTCAGACTTGAAAGCAGT-3' (配列番号: 21)
第 2 ラウンド P C R プライマー	塩 基 配 列
内方センスプライマー	5' -GCTGTCCCACTTACAGATGCA-3' (配列番号: 22)
内方アンチセンスプライマー	5' -TCAAAGCGCCAGCTGGAGTTT-3' (配列番号: 23)

尚、内部コントロールとした β アクチンのプライマーとしては、文献〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 6133, (1985)〕に記載のものを使用した。これら各プライマーは全て常法に従い化学合成した。

R T - P C R への R N A 使用量と各サンプルにおける R N A 分解の相違を標準化するために、W T 1 遺伝子の結果（デンシトメーター単位）を β アクチンのそれで除し、これを W T 1 遺伝子発現レベルとした。

結果を表 2 に示す。

表 2

由 来	細胞株	W T 発現量
胃癌	A Z 5 2 1	1. 2×10^0
大腸癌	L O V O	1. 1×10^{-3}
	S W 4 8 0	2. 3×10^{-1}
	S W 6 2 0	1. 0×10^{-1}
	C O L O 3 2 0 D M	7. 3×10^{-3}
肺癌	O S 1	1. 6×10^{-2}
	O S 2 R	8. 3×10^{-3}
	O S 3	3. 1×10^{-2}
	L U 9 9 B	2. 9×10^{-2}
	L U 9 9 C	3. 4×10^{-2}
	V M R C - L C P	4. 9×10^{-1}
乳癌	M D A M B 2 3 1	3. 3×10^{-2}
	Y M B 1	5. 2×10^{-2}
胚細胞癌	N E C 8	5. 8×10^{-3}
卵巣癌	T Y K N U	4. 5×10^{-1}
	T Y K n u. C P - r	2. 5×10^{-1}
白血病 (対照)	K 5 6 2	1. 0×10^0

上記の結果、種々の固形腫瘍由来の培養株において W T 1 遺伝子が発現していることが確認された。

以上の通り、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは固形腫瘍細胞の増殖の阻害のために有効であり、従って新規な固形腫瘍治療剤として期待される。

請 求 の 範 囲

1. ウイルムス腫瘍遺伝子 (W T 1) に対する発現阻害物質を含んで成る固形腫瘍治療剤。
2. 前記発現阻害物質がアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体である請求項 1 に記載の固形腫瘍治療剤。
3. 前記発現阻害物質が W T 1 変異遺伝子である請求項 1 に記載の固形腫瘍治療剤。
4. 前記発現阻害物質が W T 1 変異タンパク質である請求項 1 に記載の固形腫瘍治療剤。
5. 前記発現阻害物質が低分子物質である請求項 1 に記載の固形腫瘍治療剤。
6. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体がウイルス腫瘍遺伝子の転写キャッピング部位の連続する少なくとも 9 個のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 2 に記載の固形腫瘍治療剤。
7. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が、次の塩基配列：
5' -AGGGTCGAATGCGGTGGG- 3' (配列番号：2) 又は
5' -TCAAATAAGAGGGGCCGG- 3' (配列番号：4)
を有する、請求項 6 に記載の固形腫瘍治療剤。
8. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が、ウイルス腫瘍遺伝子の翻訳開始領域の連続する少なくとも 9 個のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 2 に記載の固形腫瘍治療剤。
9. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、次の塩基配列：
5' -GTCGGAGCCCATTTGCTG- 3' (配列番号：6)

を有する、請求項 8 に記載の固形腫瘍治療剤。

10. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が、ウィルムス腫瘍遺伝子のエクソン中の連続する少なくとも 9 個のヌクレオチドに対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 2 に記載の固形腫瘍治療剤。

11. 前記エクソンが第 6 エクソンである、請求項 10 に記載の固形腫瘍治療剤。

12. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が、次の塩基配列：

5' -CGTTCTGTGGTTATCGCT- 3' (配列番号：8)

を有する、請求項 11 に記載の固形腫瘍治療剤。

13. 前記固形腫瘍が胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌又は卵巣癌である、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の固形腫瘍治療剤。

Fig. 1

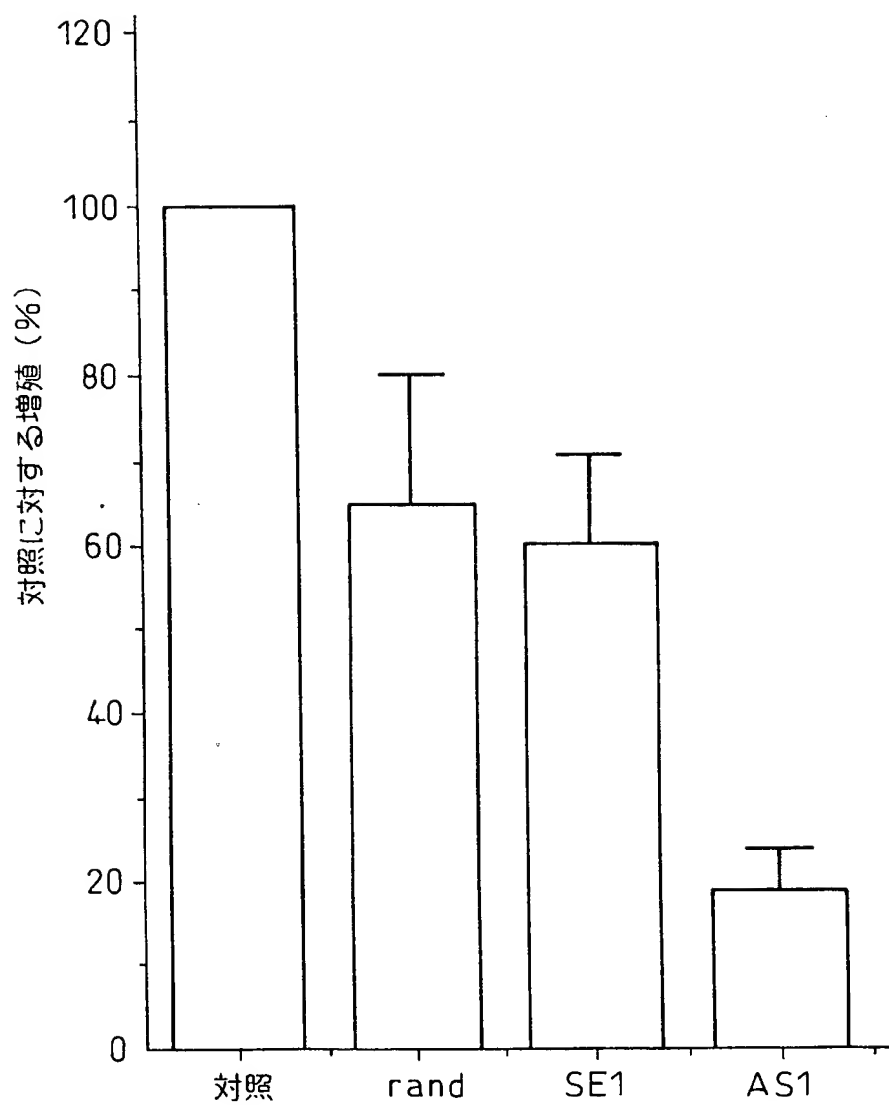


Fig.2

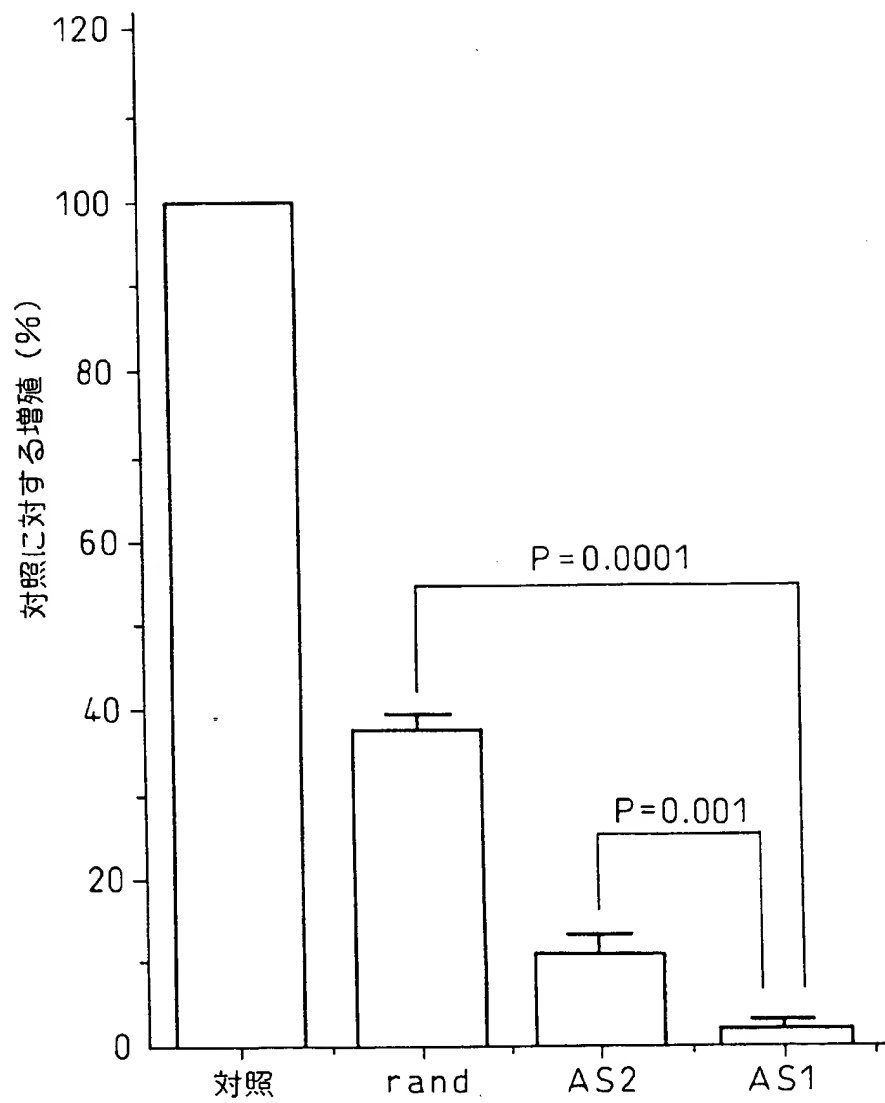


Fig.3

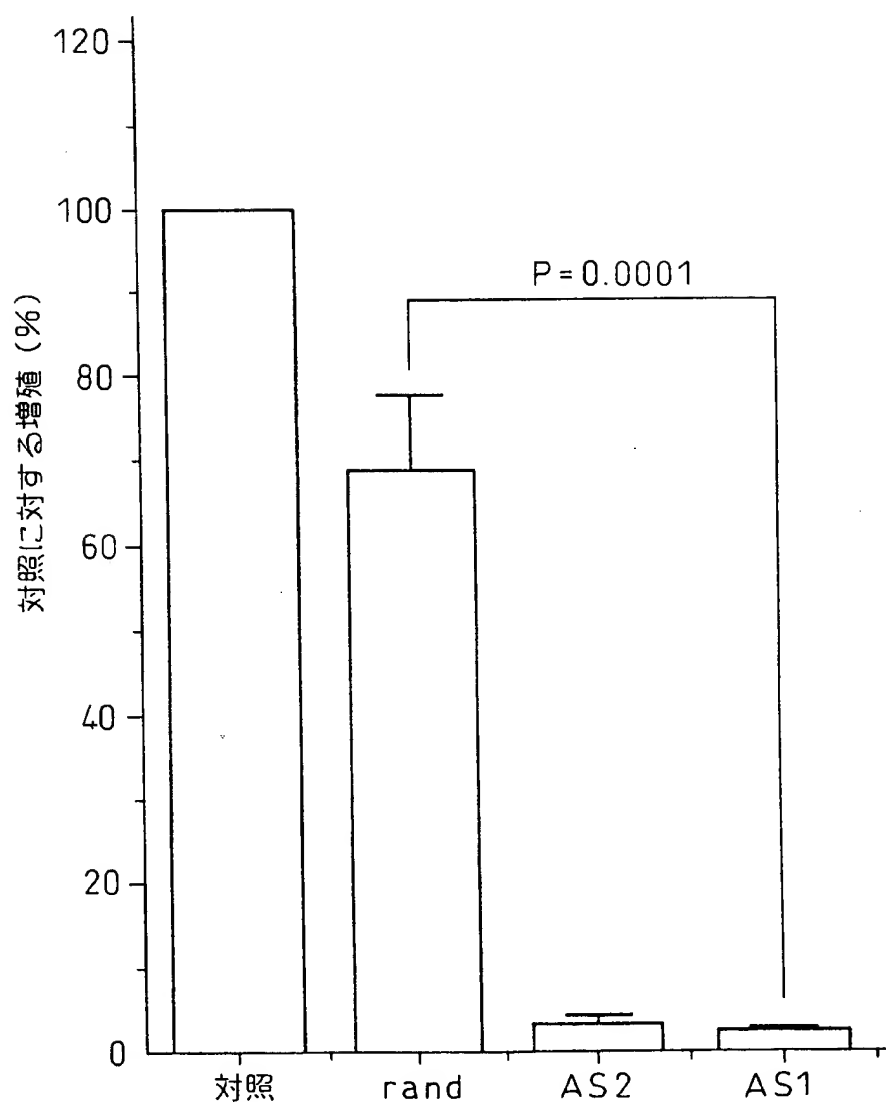


Fig.4

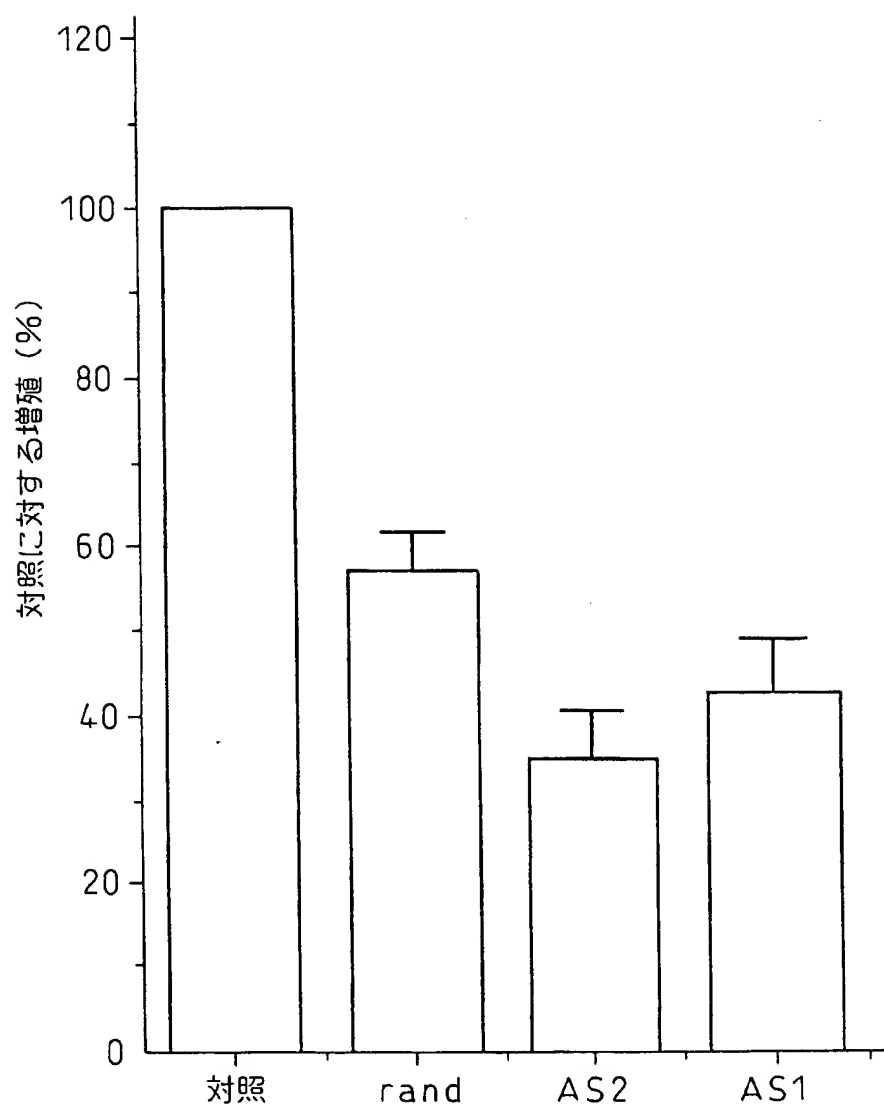


Fig.5

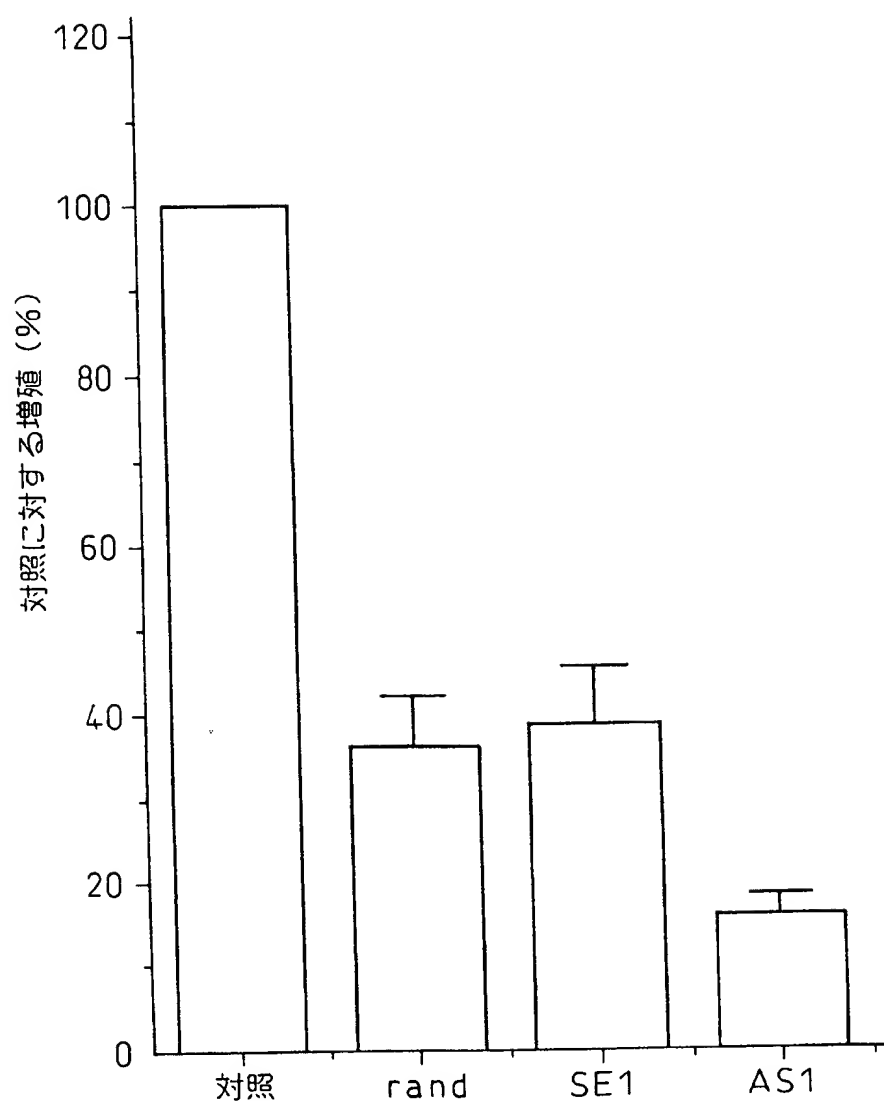


Fig.6

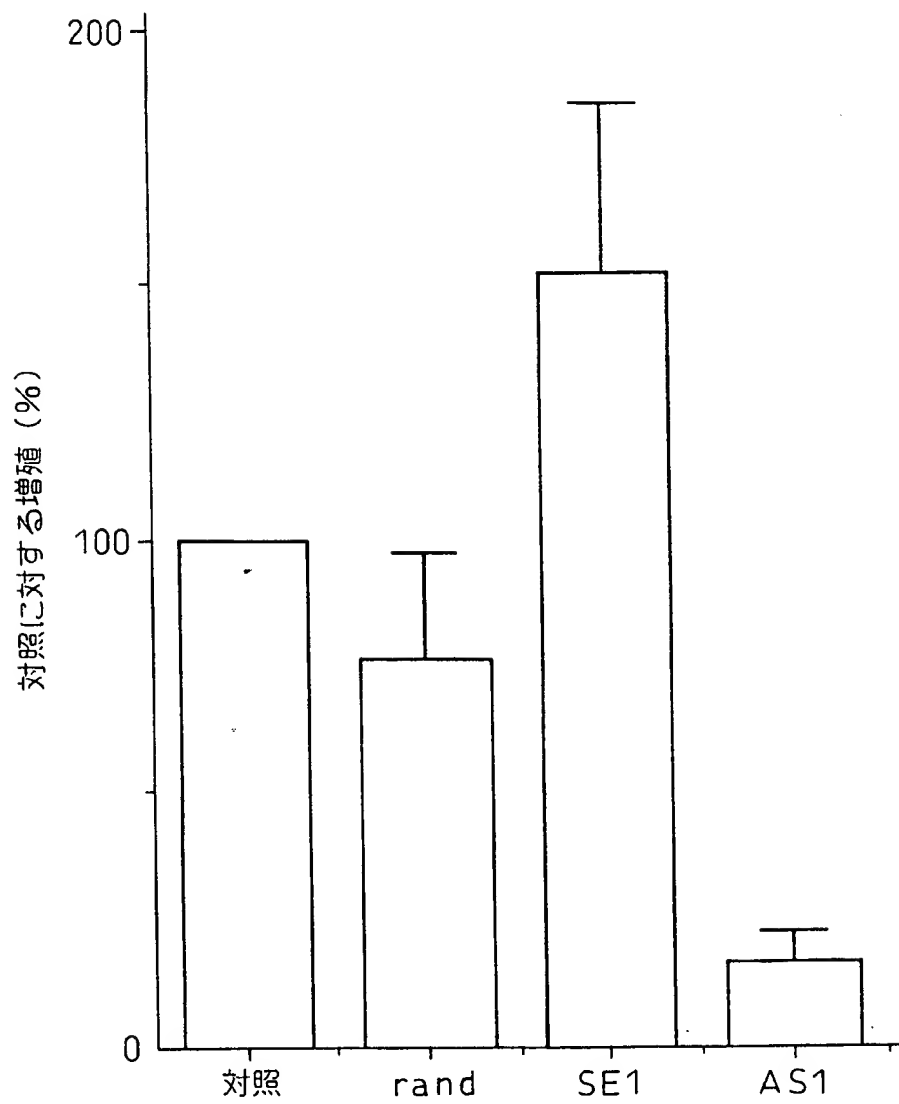
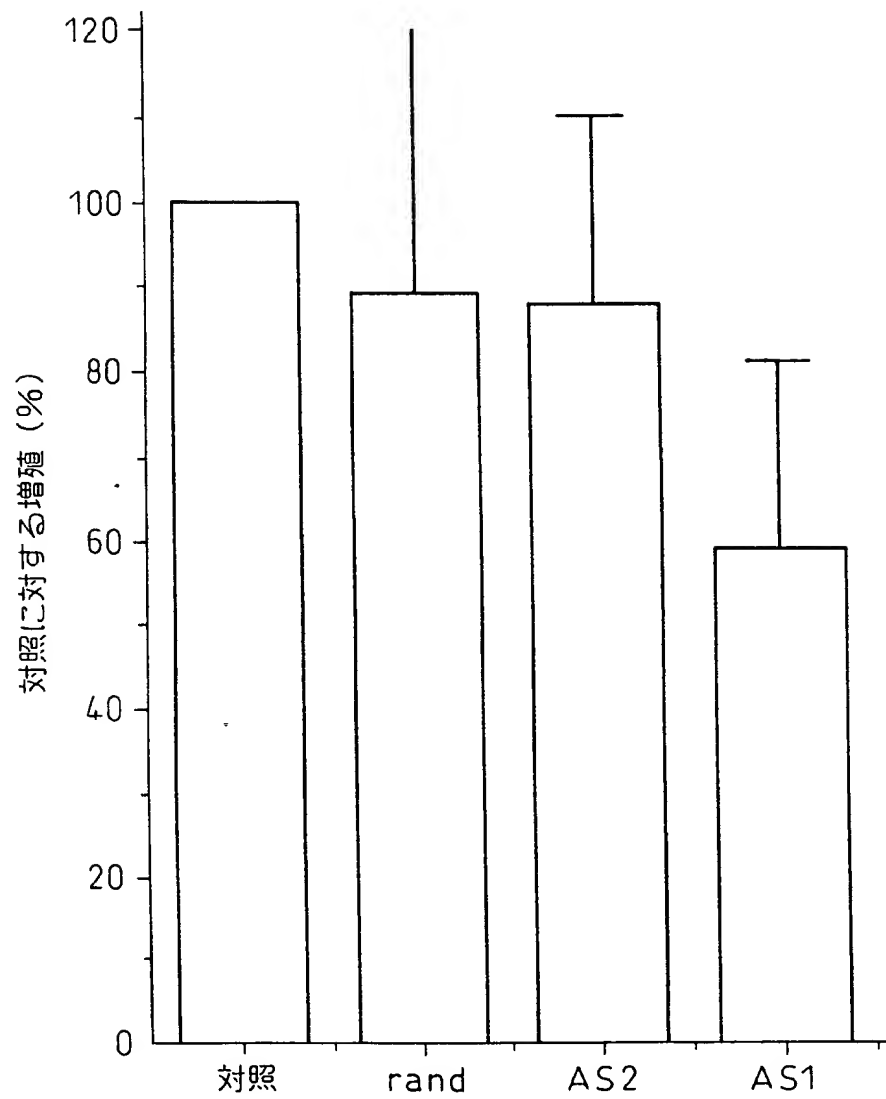


Fig.7



配 列 表

配列番号 : 1

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

CCCACCGCAT TCGACCCT

18

配列番号 : 2

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

AGGGTCGAAT GCGGTGGG

18

配列番号 : 3

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

CCGGCCCCTC TTATTGA

18

配列番号 : 4

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類：合成 D N A

配列

TCAAATAAGA GGGGCCGG

18

配列番号：5

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成 D N A

配列

CAGCAAATGG GCTCCGAC

18

配列番号：6

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成 D N A

配列

GTCCGAGCCC ATTTGCTG

18

配列番号：7

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成 D N A

配列

AGCGATAACC ACACAACG

18

配列番号：8

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列

CGTTGTGTGG TTATCGCT

18

配列番号：9

配列の長さ：1272

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列

TGGTATCCTC GACCAGGGCC ACAGGCAGTG CTCGGCGGAG TGGCTCCAGG AGTTACCCGC	60
TCCCTGCCGG GCTTCGTATC CAAACCTCC CCTTCACCCC TCCTCCCCAA ACTGGGCGCC	120
AGGATGCTCC GGCCGAATA TACGCAGGCT TTGGGCGTTT GCCAAGGGTT TTCTCCCTC	180
CTAAACTAGC CGCTGTTTT CCGGCTTAAC CGTAGAAGAA TTAGATATTC CTCACTGGAA	240
AGGGAACTA AGTGCTGCTG ACTCCAATTT TAGGTAGGCG GCAACCGCCT TCCGCCTGGC	300
GCAAACCTCA CCAAGTAAAC AACTACTAGC CGATCGAAAT ACGCCCGGCT TATAACTGGT	360
GCAACTCCCG GCCACCCAAC TGAGGGACGT TCGCTTTCAG TCCCGACCTC TGGAACCCAC	420
AAAGGGCCAC CTCTTTCCCC AGTGACCCCA AGATCATGGC CACTCCCCTA CCCGACAGTT	480
CTAGAGCAAG AGCCAGACTC AAGGGTGCAA AGCAAGGGTA TACGCTTCTT TGAAGCTTGA	540
CTGAGTTCTT TCTGCGCTTT CCTGAAGTTC CCGCCCTCTT GGAGCCTACC TGCCCTCCC	600
TCCAAACCAC TCTTTTAGAT TAACAACCCC ATCTCTACTC CCACCGCATT CGACCCTGCC	660
CGGACTCACT GCTACTGAAC GGA CTCTCCA GTGAGACGAG GCTCCACAC TGGCGAAGGC	720
AAGAAGGGGA GGTGGGGGA GGGTTGTGCC ACACCGGCCA GCTGAGAGCG CGTGTGGGT	780
TGAAGAGGAG GGTGTCTCCG AGAGGACGC TCCCTCGGAC CCGCCCTCAC CCCAGCTGCG	840
AGGGCGCCCC CAAGGAGCAG CGCGCGCTGC CTGGCCGGGC TTGGGCTGCT GAGTGAATGG	900
AGCGGCCGAG CCTCCTGGCT CCTCCTCTTC CCCGCGCCGC CGGCCCTCT TATTTGAGCT	960
TTGGGAAGCT GAGGGCAGCC AGGCAGCTGG GGTAAAGAGT TCAAGGCAGC GCCCACACCC	1020

GGGGGCTCTC CGCAACCCGA CCGCCTGTG CTCCCCACT TCCCGCCCTC CCTCCCACCT 1080
ACTCATTAC CCACCCACCC ACCCAGAGCC GGGACGGCAG CCCAGGCGCC CGGGCCCCGC 1140
CGTCTCCTCG CCGCGATCCT GGA CTTCCTC TTGCTGCAGG ACCCGGCTTC CACGTGTGTC 1200
CCGGAGCCGG CGTCTCAGCA CACGCTCCGC TCCGGGCTG GGTGCCTACA GCAGCCAGAG 1260
CAGCAGGGAG TC 1272

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 4 5 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成 D N A

配列の特徴 : W T 1 遺伝子のエクソン 1 の一部分

配列

TCTGAGCCTC AGCAAATGGG CTCCGACGTG CCGGACCTGA ACGCGCTGCT GCCCGCCGTC 60
CCCTCCCTGG GTGGCGGCGG CGGCTGTGCC CTGCCTGTGA GCGGCGCGGC GCAGTGGGCG 120
CCGGTGCTGG ACTTTGCGCC CCCGGGCGCT TCGGCTTACG GGTCGTTGGG CGGCCCCGCG 180
CCGCCACCGG CTCCGCCGCC ACCCCGCGCG CCGCGCCTC ACTCCTTCAT CAAACAGGAG 240
CCGAGCTGGG GCGGCGCGGA GCCGCACGAG GAGCAGTGCC TGAGCGCCTT CACTGTCCAC 300
TTTTCCGGCC AGTTCACTGG CACAGCCGGA GCCTGTCGCT ACGGGCCCTT CGGTCCTCCT 360
CCGCCCAGCC AGGCGTCATC CGGCCAGGCC AGGATGTTTC CTAACGCGCC CTACCTGCCC 420
AGCTGCCTCG AGAGCCAGCC CGCTATTCGC AATCAGG 457

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 1 2 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成 D N A

配列の特徴 : W T 1 遺伝子のエクソン 2

配列

GTTACAGCAC GGTACCTTC GACGGGACGC CCAGCTACGG TCACACGCCC TCGCACCATG 60
CGGCGCAGTT CCCCACCAC TCATTCAAGC ATGAGGATCC CATGGGCCAG CAGGGCTCGC 120
TGG 123

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 1 0 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列の特徴 : WT 1 遺伝子のエクソン 3

配列

GTGAGCAGCA GTACTCGGTG CCGCCCCCGG TCTATGGCTG CCACACCCCC ACCGACAGCT 60
GCACCGGCAG CCAGGCTTTG CTGCTGAGGA CGCCCTACAG CAG 103

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 7 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列の特徴 : WT 1 遺伝子のエクソン 4

配列

TGACAATTTA TACCAAATGA CATCCCAGCT TGAATGCATG ACCTGGAATC AGATGAACTT 60
AGGAGCCACC TTAAAGGG 78

配列番号 : 1 4

配列の長さ : 5 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列の特徴 : WT 1 遺伝子のエクソン 5

配列

AGTTGCTGCT GGGAGCTCCA GCTCAGTGAA ATGGACAGAA GGGCAGAGCA A 51

配列番号 : 1 5

配列の長さ : 9 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成 D N A

配列の特徴 : W T 1 遺伝子のエクソン 6

配列

CCACAGCACA GGGTACGAGA GCGATAACCA CACAACGCCC ATCCTCTGCG GAGCCCAATA 60

CAGAATACAC ACGCACGGTG TCTTCAGAGG CATTCAG 97

配列番号 : 1 6

配列の長さ : 1 5 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成 D N A

配列の特徴 : W T 1 遺伝子のエクソン 7

配列

GATGTGCGAC GTGTGCCTGG AGTAGCCCCG ACTCTTGTAC GGTCGGCATC TGAGACCACT 60

GAGAAACGCC CCTTCATGTG TGCTTACCCA GGCTGCAATA AGAGATATTT TAAGCTGTCC 120

CACTTACAGA TGCACAGCAG GAAGCACACT G 151

配列番号 : 1 7

配列の長さ : 9 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成 D N A

配列の特徴 : W T 1 遺伝子のエクソン 8

配列

GTGAGAAACC ATACCAGTGT GACTTCAAGG ACTGTGAACG AAGGTTTTCT CGTTCAGACC 60
AGCTCAAAAG ACACCAAAGG AGACATACAG 90

配列番号 : 1 8

配列の長さ : 9 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成 D N A

配列の特徴 : W T 1 遺伝子のエクソン 9

配列

GTGTGAAACC ATTCCAGTGT AAAACTTGTC AGCGAAAGTT CTCCCGGTCC GACCACCTGA 60
AGACCCACAC CAGGACTCAT ACAGGTAAAA CAA 93

配列番号 : 1 9

配列の長さ : 1 5 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成 D N A

配列の特徴 : W T 1 遺伝子のエクソン 1 0 の一部分

配列

GTGAAAAGCC CTTCAGCTGT CGGTGGCCAA GTTGTGAGAA AAAGTTTGCC CGGTCAGATG 60
AATTAGTCCG CCATCACAAC ATGCATCAGA GAAACATGAC CAAACTCCAG CTGGCGCTTT 120
GAGGGGTCTC CCTCGGGGAC CGTTCAGTGT CCCAGGCA 158

配列番号 : 2 0

配列の長さ : 2 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成 D N A

配列

GGCATCTGAG ACCAGTGAGA A

21

配列番号 : 2 1

配列の長さ : 2 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成 D N A

配列

GAGAGTCAGA CTTGAAAGCA GT

22

配列番号 : 2 2

配列の長さ : 2 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成 D N A

配列

GCTGTCCCAC TTACAGATGC A

21

配列番号 : 2 3

配列の長さ : 2 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成 D N A

配列

TCAAAGCGCC AGCTGGAGTT T

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁶ A61K48/00, A61K38/17, C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ A61K48/00, A61K38/17, C12N15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PA	WO, 97/39354, A1 (Chuzo Kishimoto et al.), 23 October, 1997 (23. 10. 97) & EP, 846949, A1	1-13
PA	Hybridoma 17[2] (Apr. 1998) Rauscher F J 3rd et al., "Characterization of monoclonal antibodies directed to the amino-terminus of the WT1, Wilms' tumor suppressor protein" p.191-198	1-13
PA	Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94[15] (22 Jul 1997) Silberstein G B et al., "Altered expression of the WT1 wilms tumor suppressor gene in human breast cancer" p.8132-8137	1-13
A	WO, 96/38176, A1 (Chuzo Kishimoto et al.), 5 December, 1996 (05. 12. 96) & JP, 9-104629, A1 & EP, 841068, A1	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 October, 1998 (13. 10. 98)Date of mailing of the international search report
27 October, 1998 (27. 10. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03198

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Blood <u>87</u> [7] (1996) Yamagami T et al., "Growth Inhibition of Human Leukemic Cells by WT1 (Wilms Tumor Gene) Antisense Oligodeoxynucleotides: Implications for the Involvement of WT1 in Leukemogenesis" p.2878-2884	1-13
A	Cancer Invest. <u>11</u> [4] (1993) Bruening W et al., "Analysis of the 11p13 Wilms' tumor supressor gene (WT1) in ovarian tumors" p.393-399	1-13
A	Am. J. Pathol. <u>140</u> [5] (1992) Gerald W L et al., "Expression of the 11p13 Wilms' tumor gene, WT1, correlates with histologic category of Wilms' tumor" p.1031-1037	1-13
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>88</u> [21] (1991) Haber D A et al., "Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1" p.9618-9622	1-13

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 98/03198	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁶ A61K48/00, A61K38/17, C12N15/12			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁶ A61K48/00, A61K38/17, C12N15/12			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に利用した用語)			
CA (STN) WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
P A	WO, 97/39354, A1 (岸本忠三 外1名) 23. 10月. 1997 (23. 10. 97) & EP, 846949, A1	1 - 1 3	
P A	Hybridoma 17[2] (Apr. 1998) Rauscher F J 3rd et al. 「Characterization of monoclonal antibodies directed to the amino-terminus of the WT1, Wilms' tumor suppressor protein」 p. 191-198	1 - 1 3	
P A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94[15] (22 Jul 1997) Silberstein G B et al. 「Altered expression of the WT1 wilms tumor suppressor gene in human breast cancer」 p. 8132-8137	1 - 1 3	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 13. 10. 98		国際調査報告の発送日 27 10. 98	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 吉住 和之  電話番号 03-3581-1101 内線 3449	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 96/38176, A1 (岸本忠三 外1名) 5.12月.1996 (05.12.96) & JP, 9-104629, A1 & EP, 841068, A1	1-13
A	Blood 87[7] (1996) Yamagami T et al. 「Growth Inhibition of Human Leukemic Cells by WT1 (Wilms Tumor Gene) Antisense Oligodeoxynucleotides: Implications for the Involvement of WT1 in Leukemogenesis」 p.2878-2884	1-13
A	Cancer Invest. 11[4] (1993) Bruening W et al. 「Analysis of the 11p13 Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in ovarian tumors」 p.393-399	1-13
A	Am. J. Pathol. 140[5] (1992) Gerald W L et al. 「Expression of the 11p13 Wilms' tumor gene, WT1, correlates with histologic category of Wilms' tumor」 p.1031-1037	1-13
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88[21] (1991) Haber D A et al. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1」 p.9618-9622	1-13